

太湖富营养化湖区秋季水体和沉积物中硝化微生物分布特征及控制因素*

吴玲^{1,2,4}, 秦红益^{1,4}, 朱梦圆³, 韩成^{1,4}, 朱广伟^{3**}, 钟文辉^{1,4**}

(1: 南京师范大学地理科学学院, 江苏省物质循环与污染控制重点实验室, 南京 210023)

(2: 常州工程职业技术学院制药与环境工程学院, 常州 213161)

(3: 中国科学院南京地理与湖泊研究所湖泊与环境国家重点实验室, 南京 210008)

(4: 江苏省地理信息资源开发与利用协同创新中心, 南京 210023)

摘要: 微生物参与下的氮循环是富营养化湖泊十分重要的生物地球化学循环过程. 采用基于 *amoA* 功能基因和 16S rRNA 基因的荧光定量 PCR、PCR-DGGE 与高通量测序等分子生物学技术, 调查秋季太湖不同水体和表层沉积物中氨氧化古菌(AOA)、氨氧化细菌(AOB)和亚硝酸盐氧化菌(NO₂-OB)群落丰度和组成, 探讨影响硝化微生物分布的关键环境因子. 结果表明, 中度富营养化的梅梁湾湖区水体表层、中层和底层水样和表层底泥中 AOA *amoA* 基因的丰度分别低于轻度富营养化的湖心区, 而不同层水样中 AOB *amoA* 基因的丰度分别高于湖心区. 梅梁湾湖区和湖心区水样中 AOA 群落组成基本相似, 2 个湖区表层沉积物样品中 AOA 群落组成亦基本相似, 水体中 AOA 群落组成与表层沉积物中 AOA 群落组成有差异, AOA 群落丰度显著受硝态氮、pH 和 DO 影响; 表层沉积物中 AOB 群落丰度有明显差异且显著受总氮含量影响, 表层沉积物中 NO₂-OB 群落丰度也有明显差异且显著受亚硝态氮含量影响. 太湖梅梁湾湖区和湖心区水体与表层沉积物 AOA 群落包括 *Nitrosopumilium* 和 *Nitrosotalea* 两大属; 表层沉积物 AOB 群落主要包括亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas*)和亚硝化螺菌(*Nitrospira*)两大属, NO₂-OB 群落主要包括硝化刺菌(*Nitrospina*)和硝化螺菌(*Nitrospira*)两大属, 其中硝化螺菌属是淡水湖泊中比较少见的亚硝酸盐氧化菌. 影响太湖水体和沉积物中 AOA 和 AOB 丰度的最主要环境因子为总氮、总磷与铵态氮. 研究表明典型富营养指标(总氮、总磷、铵态氮、硝态氮和亚硝态氮等)是影响太湖梅梁湾和湖心区水体和沉积物中 AOA 或 AOB 丰度以及硝化微生物群落丰度的重要因素.

关键词: 氨氧化细菌; 氨氧化古菌; 亚硝酸盐氧化菌; 富营养化; 沉积物; 水体; 太湖; 梅梁湾

Distribution characteristics and controlling factors of nitrifying microorganisms in freshwater and sediment of eutrophic zones in Lake Taihu in autumn

WU Ling^{1,2,4}, QIN Hongyi^{1,4}, ZHU Mengyuan³, HAN Cheng^{1,4}, ZHU Guangwei^{3**} & ZHONG Wenhui^{1,4**}

(1: Jiangsu Provincial Key Laboratory of Materials Cycling and Pollution Control, School of Geography Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, P.R.China)

(2: Institute of Pharmaceutical and Environmental Engineering, Changzhou Vocational Institute of Engineering, Changzhou 213164, P.R.China)

(3: State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, P.R.China)

(4: Jiangsu Center for Collaborative Innovation in Geographical Information Resource Development and Application, Nanjing 210023, P.R.China)

Abstract: Nitrogen cycling associated with microorganisms is the most important biogeochemical process in eutrophic lakes. In this

* 国家自然科学基金项目(41271255)、国家重点基础研究发展计划(2016YFD0200302)和江苏省高校优秀创新团队项目联合资助. 2016-10-12 收稿; 2017-01-21 收修改稿. 吴玲(1981~), 女, 博士研究生, 讲师; E-mail: lwu@czie.edu.cn.

** 通信作者; E-mail: zhongwenhui@njnu.edu.cn; gwzhu@niglas.ac.cn.

study, molecular biological techniques including quantitative PCR, PCR-DGGE, and high-throughput sequencing based on *amoA* and 16S rRNA genes were used to assess the composition and community abundance of ammonia-oxidizing archaea (AOA), ammonia-oxidizing bacteria (AOB), and nitrite-oxidizing bacteria (NOB) in freshwater and sediment samples of Lake Taihu collected during autumn. The key environmental factors affecting the distribution of nitrifying microorganisms were further analyzed. Results showed that the *amoA* gene abundance of AOA from the upper, middle, and bottom freshwater and surface sediment samples from the mesotrophic Meiliang Bay was lower than those from the less eutrophic central lake and that the *amoA* gene abundance of AOB from the mesotrophic Meiliang Bay was greater than those from the central lake. The AOA community composition in freshwater was similar in both Meiliang Bay and the central lake, it was the same for AOA in the surface sediment, and the key factors affecting AOA community abundance were nitrate, pH and dissolved oxygen contents, while the community abundance of AOB mainly affected by total nitrogen content in sediments were proven to differ considerably between the two sites. The case was the same for NOB with the key factor nitrite content. AOA of freshwater and surface sediments in Meiliang Bay and central lake included two genera, *Nitrosopumilis* and *Nitrosotalea*. AOB of the surface sediment included *Nitrosomonas* and *Nitrosospira*. NOB of the surface sediment included *Nitrospina* and *Nitrospira*, and *Nitrospina* was scarce in freshwater. The main environmental factors affecting the abundance of AOA and AOB in Lake Taihu were TN, total phosphorus (TP), and ammonium content. This study proved that the eutrophication indexes (such as total nitrogen, total phosphorus, ammonium, nitrate and nitrite) have significant influences on the abundance of AOA or AOB and community abundance of nitrifying microorganisms in both freshwater and sediments in Lake Taihu, which may help the understanding of the nitrogen cycling in the Lake Taihu ecosystem.

Keywords: Ammonia-oxidizing bacteria; ammonia-oxidizing archaea; nitrite-oxidizing bacteria; eutrophication; sediment; water; Lake Taihu; Meiliang Bay

太湖是中国五大淡水湖之一。生活污水排放与过度施用氮肥的农田径流导致太湖水体营养物质浓度升高而形成富营养化,大量的有机质、氮、磷等营养物质在湖泊沉积物中沉降富集^[1-3]。太湖污染物从西北部进入,经过水体稀释,流向东南方向,最终主要与东太湖相连的太浦河出太湖^[4]。因此,太湖从西北向东南,湖区富营养化程度逐渐下降,不同湖区的水质状况不完全相同,主要的环境因子也呈现一定浓度梯度^[5]。

太湖中部分外源无机氮以及由有机氮矿化的无机氮可以通过硝化与反硝化偶联过程转化成 N_2 被去除^[6]。其中,硝化作用是氮循环的核心环节,硝化过程由硝化微生物执行。硝化微生物包括氨氧化细菌(AOB)、氨氧化古菌(AOA)以及亚硝酸盐氧化细菌(NOB),它们不仅是氨氮转化的主要驱动者,也是反硝化作用底物硝态氮(NO_3^- -N)的生产者。氨氧化过程被认为是硝化过程的限速步骤。目前,湖泊硝化微生物的研究多以沉积物为研究对象,且研究多集中于AOA与AOB的分布、群落组成及环境影响因素研究^[6-8],而环境中的NOB由于缺乏分析手段,NOB的研究经常被忽视。随着高通量测序技术的出现,NOB越来越受关注^[9],有研究发现硝化螺菌属(*Nitrospira*)能够将 NH_3 直接氧化成 NO_3^- -N^[10]。影响湖泊水体和底泥AOA和AOB丰度的环境因子差异较大,水体中氨氧化微生物丰度通常受铵态氮(NH_4^+ -N)、DO和pH值的影响^[11];底泥的AOA丰度主要影响因素有pH、 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N、总氮(TN)、总磷(TP)和总溶解性碳^[12-13],AOB丰度主要受 NH_4^+ -N、pH和 NO_3^- -N的影响^[8]。我国淡水湖泊沉积物中AOA丰度高于AOB丰度^[6,8,14],但在高原淡水湖中沉积物AOB丰度高于AOA丰度^[15],其原因不完全清楚。氨氧化产生的亚硝态氮(NO_2^- -N)经NOB的作用被迅速氧化成 NO_3^- -N,湖泊沉积物中NOB丰度和分布主要受 NH_4^+ -N和 NO_2^- -N的影响^[16-18]。目前,关于不同富营养化水平的淡水湖泊水体和沉积物中氨氧化微生物、亚硝酸盐氧化微生物的分布、群落组成和丰度等多角度的研究报道比较少见。

太湖北部梅梁湾湖区和湖心区水体富营养化程度不同。梅梁湾是太湖污水的主要入流区之一,是太湖典型的富营养化湖区,该湖区具有藻型湖区特征,水体悬浮物浓度高于湖心区,并频繁暴发大面积的蓝藻水华^[4,8];而湖心区水体则轻度富营养化。太湖梅梁湾与湖心区水体与沉积物中环境条件不同,硝化微生物分布、群落组成和丰度也可能不同。本研究采集梅梁湾和湖心区内不同深度水体样品和沉积物样品,分析水体和沉积物样品中AOA、AOB和NOB的分布和群落组成和丰度,研究太湖不同富营养化水平水体和沉积物中硝化微生物分布和群落组成特征,并探寻驱动硝化微生物分布与群落丰度的关键环境因子。本研究有助于更全面地了解太湖生态系统氮素循环及相关功能微生物,为太湖环境保护和生态修复提供理论依据。

tem(Bio-rad, USA)实时荧光定量 PCR 仪测定水样与沉积物样品中的 AOA 和 AOB *amoA* 基因丰度. qPCR 反应体系为 20 μl , 包括 10 μl SYBR Premix Ex Taq(Takara, Shanghai, China)、上下游引物各 0.5 μl 及 2 μl 模板, 最后加入灭菌双蒸水补足到 20 μl . qPCR 反应程序为初始变性温度 95 $^{\circ}\text{C}$ 3.0 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s 循环 40 次, 83 $^{\circ}\text{C}$ 读板; 溶解曲线温度变化范围为 65.0~95.0 $^{\circ}\text{C}$. 以 AOA 和 AOB *amoA* 基因的重组质粒作为标准 DNA 模板, 分别以 10 倍梯度稀释各模板, 标准曲线浓度范围分别为 $3.62 \times 10^2 \sim 3.62 \times 10^9$ copies/ μl (AOA) 和 $7.14 \times 10^2 \sim 7.14 \times 10^9$ copies/ μl (AOB). AOA 和 AOB 的扩增效率分别为 95.4% ($R^2 = 0.997$) 和 86.1% ($R^2 = 0.986$). 水体和沉积物中的 NOB 均低于检测限, 因此没有做 NOB 的定量研究.

1.5 水体和沉积物样品 AOA 的 PCR-DGGE、克隆测序及系统发育分析

用于 DGGE 的 AOA *amoA* 基因 PCR 产物的引物为 Arch-*amoA* F 和 Arch-*amoA* R. 50 μl PCR 体系包括 5 μl 含有 20 mmol/L Mg^{2+} 的 10 \times HotStar-*Taq* buffer、2.5 μl dNTP、2.5 U 的 HotStar-*Taq* polymerase (Takara), 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物和 1 μl DNA 模板, 用灭菌双蒸水补足至 50 μl . AOA PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5.0 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min. 通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增特异性. AOA *amoA* 基因的 DGGE 分析使用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶^[21], 变性梯度范围为 20%~50%. 电泳条件为: 0.5 \times TAE 缓冲液, 70 V 电压, 60 $^{\circ}\text{C}$ 电泳 16 h. 电泳分析通过 Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad) 完成后, 采用 SYBR Green I 染料 (1:10000 的稀释倍数) (Invitrogen, USA) 对聚丙烯酰胺凝胶染色 30 min, 使用 Gel Doc XR+凝胶成像系统 (Bio-rad) 进行紫外成像.

在紫外灯下小心迅速地切割下 DGGE 胶上的典型条带, 放置于 30 μl 灭菌双蒸水中, 用枪尖捣碎, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜. 取 1 μl 洗脱出来的 DNA 溶液作为模板连同原始土壤总 DNA 进行 PCR 扩增, PCR 扩增体系和反应条件如前所述. PCR 产物参照 pEASYTM-T1 Cloning Kit (TransGen, China) 说明书进行克隆. 每个条带随机地挑选出 5 个含有 AOA *amoA* 基因片段的白色克隆, 并将克隆子进行测序 (Genscript, Nanjing, China).

用 DNASTAR 软件对测序结果进行编辑, 去除载体序列后用 BLAST 在 GenBank 数据库中搜索相似序列, 并与已发表的相关细菌和古菌的 *amoA* 功能基因序列进行多重序列比对, 使用 MEGA 4.1 软件以邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树.

1.6 沉积物样品中 AOB 和 NOB 群落丰度分析——基因组 Miseq 测序

本研究中, 水体和沉积物样品中 AOA 群落丰度采用基于 *amoA* 基因的 PCR-DGGE 分析获得, 由于部分沉积物样品中 AOB 与 NOB 功能基因丰度低, PCR 扩增产物量无法满足 DGGE 分析, 故本研究采用基于 16S rRNA 基因的 Miseq 测序分析沉积物 AOB 与 NOB 的群落及丰度. 对细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区进行 PCR 扩增, 引物为 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), 每个样本的引物 5'端加 barcode 序列, 不同样本用不同的 barcode 序列进行区分. 每个样本 3 个重复, 将同一样本的 PCR 产物混合后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen, USA) 切胶回收 PCR 产物, 再用 QuantiFluorTM-ST 蓝色荧光定量系统 (Promega, USA) 进行检测定量, 按照每个样本的测序量要求, 进行相应比例的混合. 利用 Illumina 平台进行文库构建, 由上海美吉生物公司采用 Illumina Miseq 方法进行测序, Miseq 测序基于 resample 处理来分析细菌各类群相对丰度, resample 序列数为 24000. 利用 Usearch (Version 7.1) 对测序数据进行处理, 按照 97% 相似性对非重复序列 (不含单序列) 进行 OTU 聚类, 在聚类过程中去除嵌合体, 得到 OTU 的代表序列. 利用 DNAMAN 将 AOB 和 NOB 主要类群序列与 97% 相似度的 OTUs 序列进行比对^[24].

1.7 数据分析

采用双因素方差分析 (Two-way ANOVA, Tukey 多重比较) 评估不同采样点与采样深度分别对太湖水体理化指标的影响和两因素对理化指标的交互影响; 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA, Tukey 多重比较) 评估不同数据间的差异; 采用独立样本 *T* 检验比较 HT 表层沉积物各理化指标与 ET 是否存在显著差异; 采用 Pearson 相关分析评估水体与表层沉积物 AOA 和 AOB 丰度与各环境因子的关系, $P < 0.05$ 表示具有统计显著性. 利用逐步回归分析进一步评估水体与表层沉积物 AOA 和 AOB 丰度及其比值与环境因子关系, 保留显著影响变量 ($P < 0.05$). 采用 Bio-rad image lab 4.1 软件对水体与表层沉积物中 AOA *amoA* 基因 DGGE 条带进行数字化分析, DGGE 条带的位置和相对亮度分别表征微生物种类和数量. 将 DGGE 图谱条带数字化结

果、表层沉积物中 AOB 或 NOB 各属 16S rRNA 基因相对丰度与环境因子进行逐步回归分析, 筛选显著影响变量 ($P < 0.05$). 所有分析基于 SPSS 统计软件 (SPSS, USA).

2 结果与分析

2.1 梅梁湾与湖心区水体与沉积物的理化性质

梅梁湾与湖心区水样中 TP、TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 DO 浓度均有显著差异 (表 1), 其中梅梁湾水样中 TP、TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 浓度显著高于湖心区水样, 而 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 DO 浓度显著低于湖心区水样. 另外, 梅梁湾水体中不同深度水样的 TP、TN 和 DO 浓度也有显著差异, 且表层 > 中层 > 底层. 但是不同湖区、不同深度的水样 pH 值无显著差异 (表 1). 双因素方差分析显示, TP、TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 DO 浓度显著受采样点和采样深度的影响. 参照《湖泊 (水库) 富营养化评价方法及分级技术规定》, 湖泊富营养化评价参数包括 Chl.a、TP、TN、 COD_{Mn} 和 SD, 计算得出梅梁湾湖区和湖心区综合营养状态指数 (TLI) 分别为 69 和 59, 分别属于中度富营养和轻度富营养区域.

梅梁湾表层沉积物中 TOC、TP、TN 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量显著高于湖心区, 而 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 含量、pH 和 DO 无显著差异 (表 2).

表 1 太湖水体理化指标及双因素方差分析

Tab.1 Two-way ANOVA of physicochemical index of water in Lake Taihu

| 样品 | TP/ (mg/L) | TN/ (mg/L) | $\text{NH}_4^+\text{-N}/$ (mg/L) | $\text{NO}_2^-\text{-N}/$ (mg/L) | $\text{NO}_3^-\text{-N}/$ (mg/L) | pH | DO/ (mg/L) |
|---------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| HT-U | 0.20±0.02 ^a | 2.45±0.17 ^a | 0.14±0.03 ^a | 0.01±0.00 ^a | 0.19±0.02 ^d | 8.86±0.26 ^a | 12.21±0.34 ^c |
| HT-M | 0.17±0.01 ^b | 2.18±0.17 ^b | 0.13±0.02 ^{ab} | 0.01±0.00 ^a | 0.18±0.01 ^d | 8.66±0.21 ^a | 10.97±0.25 ^d |
| HT-B | 0.14±0.02 ^c | 1.82±0.15 ^c | 0.11±0.01 ^{abc} | 0.01±0.00 ^b | 0.15±0.01 ^d | 8.61±0.20 ^a | 10.35±0.10 ^c |
| ET-U | 0.12±0.00 ^c | 1.24±0.07 ^d | 0.11±0.01 ^{cd} | 0.01±0.00 ^b | 0.57±0.02 ^a | 8.70±0.18 ^a | 14.26±0.26 ^a |
| ET-M | 0.11±0.00 ^c | 1.18±0.04 ^d | 0.10±0.01 ^{bcd} | 0.01±0.00 ^b | 0.53±0.01 ^b | 8.63±0.23 ^a | 13.54±0.23 ^b |
| ET-B | 0.11±0.01 ^c | 1.16±0.05 ^d | 0.07±0.00 ^d | 0.01±0.00 ^b | 0.47±0.03 ^c | 8.54±0.24 ^a | 12.61±0.10 ^c |
| <i>F</i> value | | | | | | | |
| 采样点 (<i>S</i>) | 58.700 ^{***} | 262.911 ^{***} | 18.705 ^{**} | 19.217 ^{**} | 1324.733 ^{***} | 0.692 | 443.437 ^{***} |
| 采样深度 (<i>L</i>) | 8.172 ^{**} | 10.369 ^{**} | 4.629 [*] | 3.464 | 18.710 ^{***} | 1.309 | 86.811 ^{***} |
| <i>S</i> × <i>L</i> | 6.728 [*] | 9.794 ^{**} | 0.285 | 0.751 | 4.397 [*] | 0.133 | 1.856 |

* 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$. 水体理化指标数值为平均值±标准偏差 ($n = 3$), 同一列上标不同小写字母表示使用 ANOVA 显示显著差异 ($P < 0.05$).

表 2 太湖沉积物理化指标独立样本 *T* 检验结果*

Tab.2 Independent sample-*T* test results of the physicochemical index of sediment in Lake Taihu

| 样品 | TOC/ % | TP/ (g/kg) | TN/ (g/kg) | $\text{NH}_4^+\text{-N}/$ (mg/kg) | $\text{NO}_3^-\text{-N}/$ (mg/kg) | $\text{NO}_2^-\text{-N}/$ (mg/kg) | pH | DO/ (mg/L) |
|------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|------------------------|
| HT-S | 2.08±0.07 ^a | 0.67±0.24 ^a | 1.35±0.02 ^a | 43.77±10.62 ^a | 3.47±1.04 ^a | 0.41±0.12 ^a | 7.77±0.12 ^a | 2.57±0.29 ^b |
| ET-S | 1.60±0.13 ^b | 0.56±0.27 ^b | 1.04±0.13 ^b | 17.71±2.27 ^b | 3.89±0.63 ^a | 0.30±0.03 ^a | 7.90±0.26 ^a | 3.50±0.22 ^a |

* 同一行上标不同小写字母表示 HT-S 和 ET-S 间有显著差异, *T* 检验 $P < 0.01$, $N = 3$.

2.2 梅梁湾与湖心区水体与沉积物中 AOA 与 AOB 丰度的分布特征及驱动因子分析

梅梁湾湖区水体表层、中层和底层水样中 AOA *amoA* 基因的丰度分别为 6.70×10^2 、 4.24×10^2 和 1.60×10^3 copies/ml, AOB *amoA* 基因的丰度分别为 1.96×10^3 、 5.25×10^2 和 7.64×10^2 copies/ml; 湖心区表层、中层和底层水样中 AOA *amoA* 基因的丰度分别为 1.54×10^3 、 5.48×10^3 和 7.69×10^3 copies/ml, AOB *amoA* 基因的丰度分别为 2.18×10^2 、 4.27×10^2 和 5.81×10^2 copies/ml (图 2). 可见, 梅梁湾湖区水体表层、中层和底层水样中 AOA

amoA 基因丰度分别低于湖心区,而 AOB *amoA* 基因丰度分别高于湖心区. 梅梁湾湖区的 AOA/AOB 丰度比显著低于湖心区,且湖区表层、中层和底层水样中 AOA/AOB 丰度比逐步升高.

梅梁湾湖区和湖心区表层沉积物 AOA *amoA* 基因丰度分别为 4.63×10^7 和 8.61×10^8 copies/g 干土, AOB *amoA* 基因丰度分别为 6.53×10^7 和 1.32×10^7 copies/g 干土. 梅梁湾湖区的 AOA/AOB 丰度比低于湖心区.

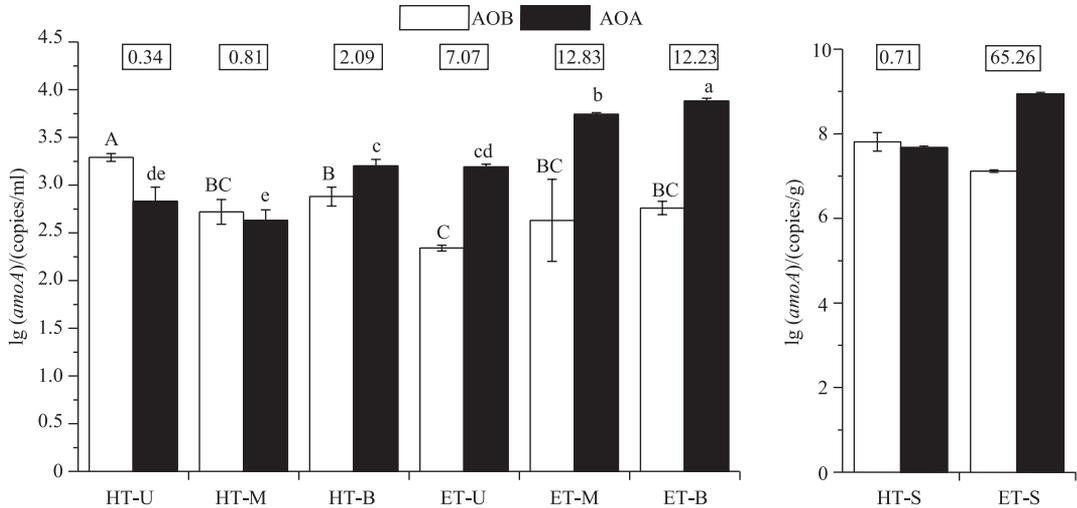


图2 太湖水体和沉积物 AOA 和 AOB *amoA* 基因丰度(方框中数字表示 AOA 与 AOB 丰度比)

Fig.2 Abundance of AOA and AOB expressed as *amoA* copy numbers per milliliter in water and per gram in sediment of Lake Taihu(The ratio of AOA to AOB were shown in the box above the chart)

逐步回归分析表明(表3),水体 AOA *amoA* 基因丰度与 TN 浓度呈显著相关($R^2 = 0.512, P < 0.01$), AOB *amoA* 基因丰度与 TP、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度呈显著相关($R^2 = 0.407, P < 0.05$), AOA/AOB 丰度比与 TP 浓度呈显著正相关,与 TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 DO 浓度均呈显著负相关($R^2 = 0.852, P < 0.001$);沉积物 AOA *amoA* 基因丰度与 TN、TP、DO 浓度均呈显著相关($R^2 = 0.943, P < 0.001$),沉积物 AOB *amoA* 基因丰度与 TN、DO 浓度均呈显著相关($R^2 = 0.720, P < 0.01$),沉积物 AOA/AOB 丰度比与 TN 浓度呈显著负相关($R^2 = 0.370, P < 0.05$).可见,影响太湖水体和沉积物中 AOA 和 AOB 群落丰度的最主要环境因子是 TN、TP 与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$.

表3 逐步回归分析筛选的与水体和沉积物中 AOA、AOB *amoA* 基因丰度相关的环境因子

Tab.3 Environmental factors passed through stepwise analysis to correlate with the abundance of AOA and AOB *amoA* gene in water and sediment

| 因变量 | 相关变量 | R^2 |
|---------------|-------------------------------------|-----------|
| 水体 AOA | TN | 0.512 ** |
| 水体 AOB | TP、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ | 0.407 * |
| 水体 AOA/AOB | TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TP、DO | 0.852 *** |
| 表层沉积物 AOA | TN、TP、DO | 0.943 *** |
| 表层沉积物 AOB | TN、DO | 0.720 ** |
| 表层沉积物 AOA/AOB | TN | 0.370 * |

*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$.

2.3 梅梁湾与湖心区水体与沉积物中 AOA 群落组成

梅梁湾湖区和湖心区水样与表层沉积物样品中 AOA *amoA* 基因共有 7 条 DGGE 条带(OTU,图3).其中,TH AOA-1、2、3、4 是水样和沉积物样品共有条带,TH AOA-5、6 是水样中的特有条带,TH AOA-7 是沉积物中的特有条带.聚类分析显示,梅梁湾湖区和湖心区水样 AOA 的 DGGE 带谱聚在一簇,两湖区沉积物

AOA 的 DGGE 带谱也聚在一簇. 梅梁湾湖区和湖心区水样、表层沉积物样品中 AOA 群落组成基本相似 (图 4).

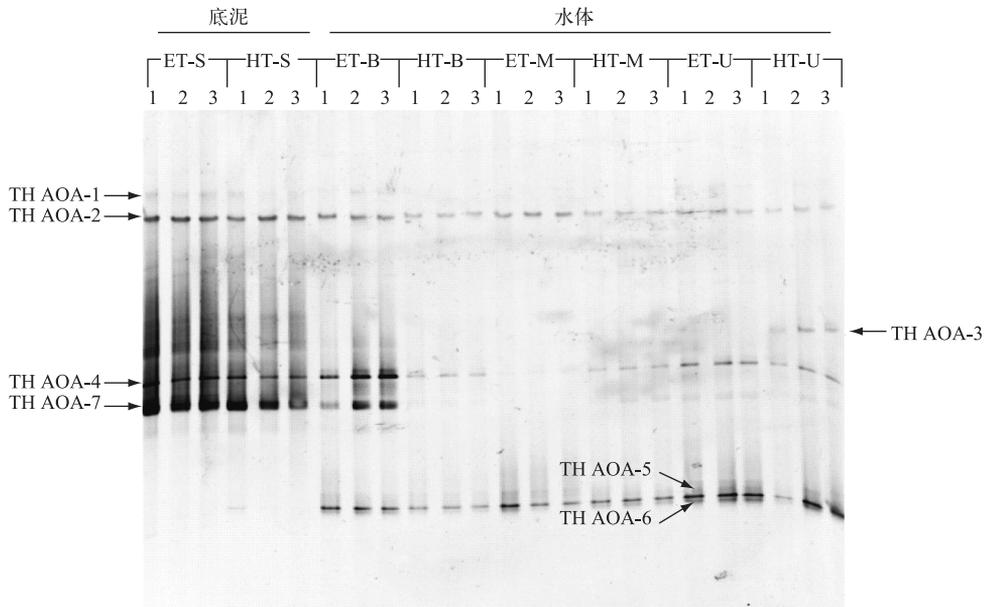


图 3 太湖水体和表层沉积物氨氧化古菌 *amoA* 基因 DGGE 图谱

Fig.3 DGGE fingerprint of archaeal *amoA* gene within water and surface sediments in Lake Taihu

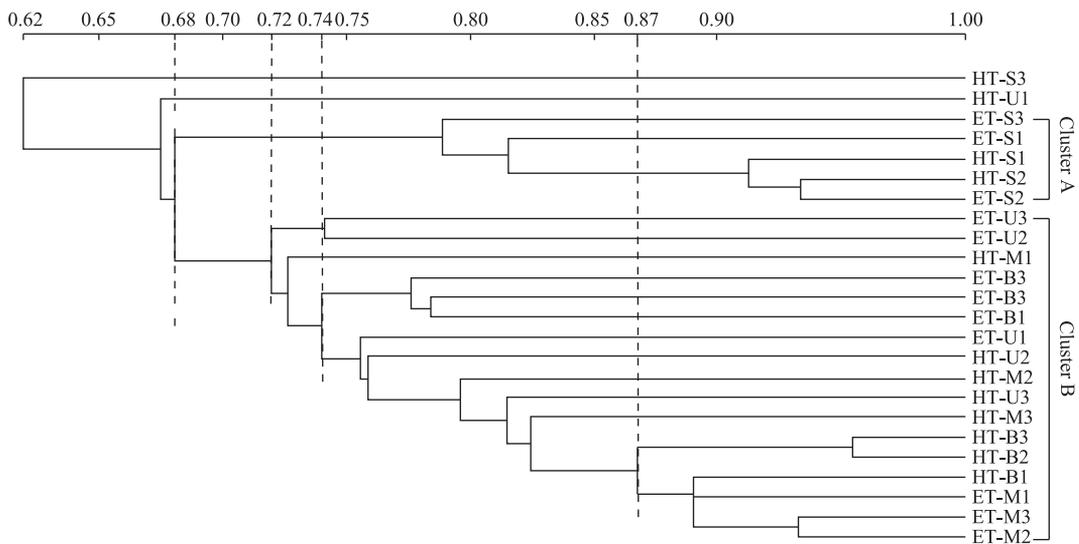


图 4 太湖水体和表层沉积物 AOA *amoA* 基因 DGGE 指纹图谱聚类分析

Fig.4 Cluster analysis of DGGE fingerprint of archaeal *amoA* gene of water and surface sediments in Lake Taihu

克隆测序及系统发育分析表明(图 5),AOA *amoA* 基因序列可分为 3 类,TH AOA-1、2 和 7 属于 *Nitrosopumilis* (1.1a group), 与海洋水体和沉积物的 AOA 亲缘关系较近;TH AOA-4 属于 *Nitrososphaera* (1.1b group), 与土壤中的 AOA 亲缘关系较近. 水样中特有序列 TH AOA-5 和 6 属于 *Nitrosotalea* (1.1a-associated group), 多见于酸性水稻土壤中, 且与酸性土壤硝化古菌 *Nitrosotalea devanatterra* 具有最近的亲缘关系.

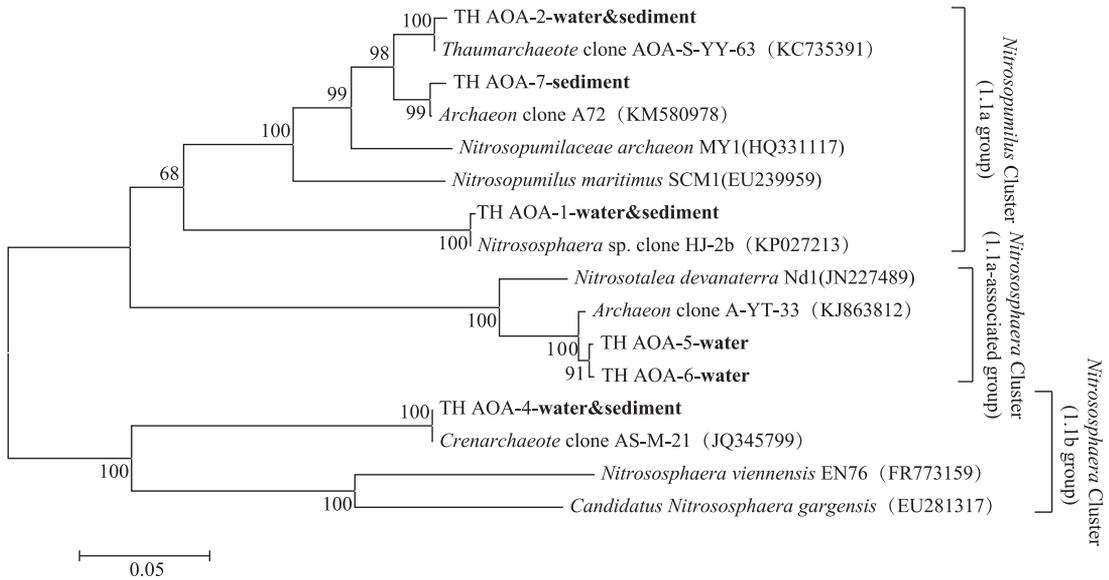


图5 太湖水体和表层沉积物氨氧化古菌 *amoA* 基因系统发育分析

Fig.5 Phylogenetic tree showing the relationship between the archeal *amoA* gene sequences obtained from DGGE bands

2.4 梅梁湾与湖心区沉积物中 AOB 和 NOB 群落组成与丰度

基于 16S rRNA 基因 Miseq 高通量测序结果表明,太湖表层沉积物样品中 AOB 群落主要包括亚硝化螺旋菌(*Nitrosospira*)和亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas*)两大属,其中梅梁湾湖区表层沉积物中 AOB 群落以亚硝化螺旋菌为主,其相对丰度为 97.54%;湖心区表层沉积物中亚硝化螺旋菌与亚硝化单胞菌相对丰度分别为 48.57%和 51.43%(图 6)。富营养化水平不同的梅梁湾湖区和湖心区表层沉积物中 AOB 群落丰度有明显差异。

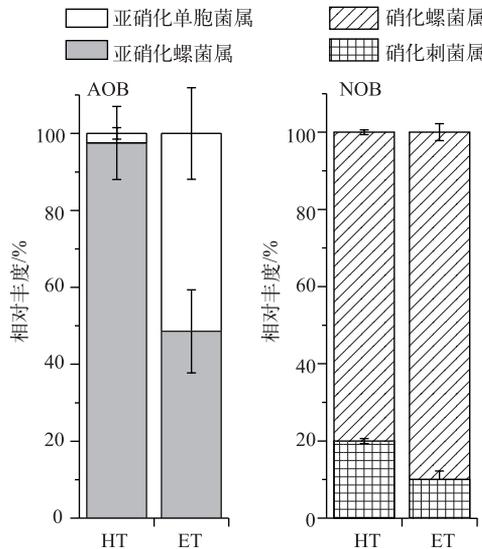


图 6 采样点 HT 和 ET 沉积物中氨氧化细菌及亚硝酸盐氧化菌 16S rRNA 基因相对丰度

Fig.6 Relative abundance of ammonia-oxidizing and nitrite-oxidizing bacteria 16S rRNA gene sequences of the sediments in HT and ET sites

太湖表层沉积物样品中 NOB 群落主要包括硝化螺菌(*Nitrosospira*)和硝化刺菌(*Nitrospina*)两大属,梅梁

湾湖区与湖心区表层沉积物中均以硝化螺菌为主, 2个湖区硝化螺菌的相对丰度分别为 80.0% 和 90.0% (图 6). 富营养化水平不同的梅梁湾湖区和湖心区表层沉积物中 NOB 群落丰度有明显差异.

2.5 AOA、AOB 与 NOB 群落丰度与环境因子相关性分析

HT 与 ET 采样点水体和表层沉积物 AOA 及表层沉积物 AOB 与 NOB 群落丰度与环境因子的关系如表 4. 逐步回归分析显示, 水体与沉积物共有条带 AOA-1、2 和沉积物特有带 AOA-7 所属的 *Nitrosopumilis* (1.1a group) 丰度主要与 NO_3^- -N 浓度呈显著正相关, 水体特有带 AOA-5、6 所属的 *Nitrosotalea* (1.1a-associated group) 丰度主要与 pH、DO 浓度呈显著正相关. 表层沉积物中亚硝化单胞菌 (*Nitrosomonas*)、亚硝化螺菌 (*Nitrospira*) 丰度与 TN 浓度呈显著相关, 硝化螺菌 (*Nitrospira*)、硝化刺菌 (*Nitropina*) 丰度均与 NO_2^- -N 浓度呈显著相关.

表 4 AOA、AOB 与 NOB 群落丰度与环境因子的逐步回归分析
Tab.4 Stepwise regression analysis between AOA, AOB and NOB community composition and the environmental factors

| 因变量 | 相关变量 | R^2 |
|----------------------------------------------------|--------------------|--------------------|
| AOA (<i>Nitrosopumilis</i> , DGGE band AOA-1、2、7) | NO_3^- -N | 0.739 ** |
| AOA (<i>Nitrosotalea</i> , DGGE band AOA-5、6) | pH、DO | 0.439 **, 0.421 ** |
| AOB (<i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrospira</i>) | TN | 0.933 ** |
| NOB (<i>Nitrospira</i> , <i>Nitropina</i>) | NO_2^- -N | 0.666 ** |

** 表示 $P < 0.01$.

3 讨论

3.1 梅梁湾与湖心区水体和沉积物中硝化微生物群落特征及群落丰度的环境影响因子

本研究多角度地研究中度富营养化的太湖梅梁湾湖区和轻度富营养化的湖心区水体与表层沉积物中氨氧化微生物、亚硝酸氧化微生物的分布、群落组成和丰度等. 梅梁湾湖区与湖心区水样中 AOA 群落组成基本相似, 两湖区表层沉积物样品中 AOA 群落组成亦基本相似, 水体中 AOA 群落组成与表层沉积物中 AOA 群落组成有差异; 两湖区表层沉积物中 AOB 与 NOB 群落丰度均有明显差异.

太湖 2 个湖区表层沉积物的 AOA *amoA* 序列属于海洋古菌类群 1.1a group 和土壤古菌类群 1.1b group, 证实了从太湖沉积物中获得的大部分 AOA *amoA* 序列与土壤和海洋环境中的 AOA *amoA* 序列有关^[12,14]; 水体特有 AOA *amoA* 序列属于水稻土壤类群 1.1a-associated group, 此可能与土壤径流有关. 逐步回归分析结果表明, *Nitrosopumilis* (1.1a group) 丰度主要与 NO_3^- -N 呈显著正相关, 说明 *Nitrosopumilis* 可以促进硝酸盐的积累; *Nitrosotalea* (1.1a-associated group) 丰度主要与 pH、DO 呈显著正相关, DO 作为氨氧化反应底物是影响水体氨氧化微生物群落组成及丰度的重要因素; pH 能通过影响氨氧化反应底物的化学形态、浓度与有效性来影响含 *amoA* 基因微生物的群落组成及丰度^[25].

太湖梅梁湾湖区和湖心区表层沉积物 AOB 群落主要包括亚硝化螺菌和亚硝化单胞菌两大属. 亚硝化螺菌和亚硝化单胞菌是淡水湖泊生态系统最常见的 2 种 AOB^[12,26-28]. 中度富营养化的梅梁湾湖区表层沉积物 AOB 优势菌为亚硝化螺菌, Xing 等^[29] 也有相似研究结果. 梅梁湾湖区表层沉积物中亚硝化螺菌的相对丰度远高于湖心区, 随着营养化水平的降低, 亚硝化螺菌相对丰度下降; 在轻度营养化的湖心区表层沉积物中, 亚硝化螺菌和亚硝化单胞菌丰度基本接近, 亚硝化螺菌可能比亚硝化单胞菌更适应富营养水平较高的环境. 逐步回归分析结果表明, 太湖表层沉积物中 TN 含量显著影响 AOB 群落丰度. 沉积物中微生物可以促进有机氮的矿化, 矿化产生的氨是氨氧化过程的底物和氨氧化微生物的主要能量来源, 因此, TN 浓度可以提高氨氧化微生物的活性^[14], 从而影响 AOA 或 AOB 的群落组成与丰度^[30].

太湖梅梁湾湖区和湖心区表层沉积物中 NOB 主要包括硝化螺菌和硝化刺菌两大属, 在太湖中发现的硝化刺菌是淡水湖泊中比较少见的 NOB. 硝化刺菌多见于海洋环境, 适宜在缺氧的深海环境中生长^[11,13,31], 太湖中特有的硝化刺菌可能是由于太湖地区历史上经历过多次海陆交替而留存^[32]. 在湖心区表层沉积物中

发现 54.35% 的硝化细菌为 *Candidatus Nitrotoga arctica* DQ839562.1 (BLAST identity 参数为 95%), 该菌能适应冷环境并可在 10~17℃ 的环境中富集^[33]。水体富营养化水平能够影响表层沉积物中 NOB 的群落丰度, 湖心区表层沉积物中硝化螺菌的比例高于梅梁湾湖区。逐步分析结果表明, 作为 NOB 催化的反应底物 NO₂-N, 其含量是影响 NOB 群落丰度的主要因素。

3.2 梅梁湾与湖心区水体和沉积物中 AOA 与 AOB 丰度分布的环境影响因子

研究表明, 淡水水体和沉积物中氨氧化微生物丰度和分布通常受 NH₄⁺-N、TN、无机盐、DO、pH、温度等因素的影响^[11,14-15,19]。本研究显示, 水体 AOA 丰度与 TN 浓度呈显著相关, AOB 丰度与 TP、NH₄⁺-N 浓度均呈显著相关; 表层沉积物 AOA 丰度与 TN、TP 和 DO 浓度均呈显著相关, AOB 丰度与 TN、DO 浓度呈显著相关。根据文献^[12,34]报道, 淡水湖泊沉积物中的 TP 含量是 AOA 丰度的显著影响因子, 可能是由于 AOA 基因组含有 P 相关的代谢基因, 如 *Nitrosospira* 含有催化合成 6-磷酸果糖的葡萄糖异构酶的所有编码基因^[35]。

影响水体 AOA/AOB 丰度比的主要因素有 TN、NH₄⁺-N、TP 和 DO, 2 个湖区水样从上至下的 TN、NH₄⁺-N、TP 和 DO 值都呈下降趋势, 表明 AOB 更适合在高氮、高磷的富营养环境下生长, 而 AOA 更适宜在相对低氮、低磷的富营养水平低或贫营养环境中存活^[34,36]。在氮含量较少的情况下, AOA 在与其他微生物竞争底物 NH₄⁺-N 时占有绝对的优势。因此, 在 NH₃ 浓度极低的贫营养水体中 AOA 丰度远高于 AOB。AOA/AOB 丰度比在水体中的垂直分布差异还与它们对氧气的的需求有关, AOA 广泛地分布于海洋、土壤、沉积物环境中好氧到缺氧的环境中^[21], 它们更适应缺氧的环境。太湖是一个浅层湖泊, 它的水体和表层沉积物有着比较充分的交换作用, 氧气能够通过交换作用从水中传递到表层沉积物中^[34]。而太湖水体从上到下, DO 值不断下降, AOA 在 DO 值较低的底层水体中更具优势。

梅梁湾湖区和湖心区表层沉积物的 AOA/AOB 的比率分别为 0.71 和 65.26, 梅梁湾湖区表层沉积物中 AOB 更具优势, 湖心区则相反, 与水体中 AOA 与 AOB 的分布趋势基本一致。此结果与 Hou 等^[6]的相似, 但与 Wu 等^[12]和 Zeng 等^[14]的结果有差异, 可能是由于采样时间与季节不同引起的各湖区富营养程度的差异而造成的。研究同时表明, 影响表层沉积物 AOA *amoA* 基因丰度的主要因素有 TN、TP 和 DO, 影响表层沉积物 AOB *amoA* 基因丰度的主要因素有 TN 和 DO, 影响表层沉积物 AOA/AOB 丰度比的主要因素有 TN, 说明氮、磷和溶解氧的含量是影响沉积物中氨氧化微生物丰度的主要因素, 此结果与文献^[8,11,15]一致。

4 结论

典型富营养化指标 (TN、TP、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N 和 NO₂⁻-N 等) 是影响太湖梅梁湾和湖心区水体和沉积物中 AOA 或 AOB 丰度以及硝化微生物群落丰度的重要因素。中度富营养化的梅梁湾湖区表层、中层水样与表层沉积物样品的 AOB 丰度高于 AOA, 轻度富营养化的湖心区水样与表层沉积物样品 AOA 丰度高于 AOB。梅梁湾湖区和湖心区水样中 AOA 群落组成基本相似, 表层沉积物样品中 AOA 群落组成基本相似, 水体中 AOA 群落组成与表层沉积物中 AOA 群落组成有差异; 梅梁湾湖区 AOB 优势菌为亚硝化螺旋菌, 湖心区的亚硝化螺旋菌与亚硝化单胞菌的丰度基本相同; 两湖区 NOB 均以硝化螺菌为主。研究表明富营养化程度显著影响太湖梅梁湾和湖心区水体或沉积物中硝化微生物分布和群落丰度, 有助于全面了解太湖生态系统氮素循环及相关功能微生物。

5 参考文献

- [1] Canfield DE, Glazer AN, Falkowski PG. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science*, 2010, **330**(6001): 192-196.
- [2] Galloway JN, Townsend AR, Erisman JW *et al.* Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions and potential solutions. *Science*, 2008, **320**(5878): 889-892.
- [3] Sun Xiaojing, Qin Boqiang, Zhu Guangwei. Release of colloidal phosphorus, nitrogen and organic carbon in the course of dying and decomposing of cyanobacteria. *China Environmental Science*, 2007, **27**(3): 341-345. [孙小静, 秦伯强, 朱广伟. 蓝藻死亡分解过程中胶体态磷、氮、有机碳的释放. *中国环境科学*, 2007, **27**(3): 341-345.]
- [4] Zhu Guangwei, Qin Boqiang, Gao Guang *et al.* Accumulation characteristics of heavy metals in the sediments of Lake Taihu. *J Lake Sci*, 2005, **17**(2): 143-150. DOI:10.18307/2005.0209. [朱广伟, 秦伯强, 高光等. 太湖近代沉积物中

- 重金属元素的累积. 湖泊科学, 2005, 17(2): 143-150.]
- [5] Qin Boqiang, Hu Weiping, Chen Weimin *et al* eds. Evolution process and mechanism of aquatic environment in Taihu. Beijing: Science Press, 2004. [秦伯强, 胡维平, 陈伟民等. 太湖水环境演化过程与机理. 北京: 科学出版社, 2004.]
- [6] Hou J, Song CL, Cao XY *et al*. Shifts between ammonia-oxidizing bacteria and archaea in relation to nitrification potential across trophic gradients in two large Chinese lakes (Lake Taihu and Lake Chaohu). *Water Research*, 2013, 47(7): 2285-2296.
- [7] Nicol GW, Leininger S, Schleper C *et al*. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria. *Environ Microbiol*, 2008, 10: 2966-2978.
- [8] Zhao DY, Zeng J, Wan WH *et al*. Vertical distribution of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in sediments of a eutrophic lake. *Curr Microbiol*, 2013, 67: 327-332.
- [9] Sorokin DY, Lucker S, Vejmekova D *et al*. Nitrification expanded: Discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum Chloroflexi. *ISME*, 2012, 6: 2245-2256.
- [10] Holger D, Elena VL, Petra P *et al*. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 2015, 528: 504-509.
- [11] Wang Chao, Shan Baoqing. The distribution of aerobic ammonia oxidizing microorganisms in Ziya River, Haihe Basin. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2012, 32(12): 2943-2950. [王超, 单保庆. 子牙河水系水和沉积物好氧氨氧化微生物分布特征. 环境科学学报, 2012, 32(12): 2943-2950.]
- [12] Wu YC, Xiang Y, Wang JJ *et al*. Heterogeneity of archaeal and bacterial ammonia oxidizing communities in Lake Taihu, China. *Environ Microbiol Rep*, 2010, 2: 569-576.
- [13] Liu B, Li YM, Zhang JP *et al*. Abundance and diversity of ammonia-oxidizing microorganisms in the sediments of Jinshan Lake. *Curr Microbiol*, 2014, 69: 751-757.
- [14] Zeng J, Zhao DY, Huang R *et al*. Abundance and community composition of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in two different zones of Lake Taihu. *Canadian Journal of Microbiology*, 2012, 58(8): 1018-1026.
- [15] Liu Y, Zhang JX, Zhao L *et al*. Distribution of sediment ammonia-oxidizing microorganisms in plateau freshwater lakes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 4435-4444.
- [16] Chen Guoyuan, Huang Xiaoming. Distribution and role of nitrifying bacteria in the sediments of Xihu Lake in Quanzhou. *Microbiology China*, 2011, 38(11): 1632-1638. [陈国元, 黄晓鸣. 泉州西湖沉积物中硝化细菌的分布及其作用. 微生物学通报, 2011, 38(11): 1632-1638.]
- [17] Attard E, Poly F, Commeaux C *et al*. Shifts between *Nitrospira*- and *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers underlie the response of soil potential nitrite oxidation to changes in tillage practices. *Environmental Microbiology*, 2010, (12): 315-326.
- [18] Manser R, Gujer W, Siegrist H. Decay processes of nitrifying bacteria in biological wastewater treatment systems. *Water Research*, 2006, 12(40): 2416-2426.
- [19] Gutierrez T, Singleton DR, Berry D *et al*. Hydrocarbon-degrading bacteria enriched by the Deepwater Horizon oil spill identified by cultivation and DNA-SIP. *International Society for Microbial Ecology*, 2013, 7: 2091-2104.
- [20] Jin Xiangcan, Tu Qingying eds. Investigation specification for limnology eutrophication (Second Edition). Beijing: Chinese Environmental Science Press, 1990. [金相灿, 屠清瑛. 湖泊富营养化调查规范(第二版). 北京: 中国环境科学出版社, 1990.]
- [21] Wang XL, Han C, Zhang JB *et al*. Long-term fertilization effects on active ammonia oxidizers in an acid upland soil in China. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 84: 28-37.
- [22] Francis CA, Roberts KJ, Beman JM *et al*. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 14683-14688.
- [23] Rothauwe JH, Witzel KP, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12): 4704-4712.
- [24] Chen CJ, Sun FQ, Zhang HQ *et al*. Evaluation of COD effect on anammox process and microbial communities in the anaerobic baffled reactor (ABR). *Bioresource Technology*, 2016, 216: 571-578.
- [25] Nicol GW, Leininger S, Schleper C *et al*. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 2966-2978.

- [26] Chen GY, Qiu SL, Zhou YY. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria in eutrophic and oligotrophic basins of a shallow Chinese lake (Lake Donghu). *Research in Microbiology*, 2009, **160**(3): 173-178.
- [27] Monique JMDB, Arjen GCLS, George AK *et al.* Shifts in the dominant populations of ammonia-oxidizing betasubclass Proteobacteria along the eutrophic Schelde estuary. *Aquatic Microbial Ecology*, 2001, **23**(3): 225-236.
- [28] Kooops HP, Pommerening-Röser A. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, **37**(1): 1-9.
- [29] Xing P, Kong FX, Chen KN *et al.* Ammonia-oxidizing bacteria community composition at the root zones of aquatic plants after ecological restoration. *Environment Science*, 2008, **29**(8): 2154-2159.
- [30] Zheng YL, Hou LJ, Newell S *et al.* Community dynamics and activity of ammonia-oxidizing prokaryotes in intertidal sediments of the Yangtze Estuary. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, **80**(1): 408-419.
- [31] Eva S, Sabine K, Thilo W *et al.* Characterization of a new marine nitrite oxidizing bacterium, *Nitrospina watsonii* sp. nov., a member of the newly proposed phylum "Nitrospinae". *Systematic and Applied Microbiology*, 2014, **37**(3): 170-176.
- [32] Wang Suming, Dou Hongshen eds. Lakes of China. Beijing: Science Press, 1998: 261-268. [王苏民, 窦鸿身. 中国湖泊志. 北京: 科学出版社, 1998: 261-268.]
- [33] Christner BC, Prisco JC, Amanda M. A microbial ecosystem beneath the West Antarctic ice sheet. *Nature*, 2014, **512**: 310-319.
- [34] Rippey B, Jewson DH. The rates of sediment-water exchange of oxygen and sediment bioturbation in Lough Neagh, Northern Ireland. *Hydrobiologia*, 1982, **91/92**(1): 377-382.
- [35] Spang A, Poehlein A, Offre P *et al.* The genome of the ammonia-oxidizing Candidatus *Nitrososphaera gargensis*: Insights into metabolic versatility and environmental adaptations. *Environmental Microbiology*, 2012, **14**(12): 3122-3145.
- [36] Yang YY, Zhang JX, Zhao Q *et al.* Sediment ammonia-oxidizing microorganisms in two plateau freshwater lakes at different trophic states. *Microbial Ecology*, 2016, **71**: 257-265.